

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 758**

51 Int. Cl.:
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/551 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05825944 .1**
96 Fecha de presentación: **09.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1827403**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **Composiciones para el tratamiento de patologías oculares de superficie**

30 Prioridad:
09.12.2004 FR 0413136

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.06.2012

73 Titular/es:
BUENO, LIONEL
1 CHEMIN DE LAUBARÈDE
31840 AUSSONNE, FR;
DROY-LEFAIX, MARIE-THERESE y
CARON, PHILIPPE

72 Inventor/es:
Bueno, Lionel;
Droy-Lefaix, Marie-Thérèse y
Caron, Philippe

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 383 758 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para el tratamiento de patologías oculares de superficie

La presente solicitud se refiere a composiciones para el tratamiento de patologías oculares, en particular de patologías oculares de superficie en los mamíferos, especialmente en el ser humano o animal. La invención se refiere más particularmente a composiciones que permiten regular la permeabilidad paracelular del epitelio ocular de superficie, correspondiente al segmento anterior del ojo. Las composiciones de la invención se basan especialmente en la utilización de agentes o condiciones que modulan la tensión del citoesqueleto de las células epiteliales de la conjuntiva y de la córnea. La invención se puede utilizar para el tratamiento preventivo o curativo de afecciones oculares de superficie tales como las afecciones provocadas por una alergia (conjuntivitis alérgica por ejemplo) o una inflamación, las conjuntivitis infecciosas, las queratitis variadas y la enfermedad del ojo seco.

A nivel del segmento anterior del ojo, el epitelio de la córnea y el de la conjuntiva no están queratinizados y son de tipo estratificado. Protegen el ojo de las agresiones exteriores, siendo la superficie ocular una mucosa de transición entre el medio ocular profundo y el medio exterior. Este epitelio es una barrera anatómica y funcional que, por su estructura y la cualidad de interfaz con la película lacrimal, protege los constituyentes de la conjuntiva, la córnea, así como el medio endocular. Este epitelio es una barrera competitiva entre la pérdida de líquido y la entrada de patógenos. Ésta protege también el ojo de cualquier abrasión. Para que esta barrera sea eficaz, las células que constituyen el epitelio se deben adherir estrechamente las unas a las otras. Se deben adherir igualmente a los constituyentes celulares subyacentes (Apostol S. et Carstocea B. *Oftalmologia* 1994; 38(2) 101-6). Dada la posición vulnerable que ocupa el epitelio situado en el exterior del ojo, la respuesta del epitelio a cualquier agresión debe ser rápida y eficaz.

Los inventores han descubierto que la resistencia de la barrera epitelial ocular descrita anteriormente está asociada a la permeabilidad de este epitelio. El epitelio ocular es el único centro de intercambios entre el medio exterior del ojo (constituido esencialmente por lágrimas) y el medio interior. Estos intercambios se pueden efectuar o bien a través de las células del epitelio, o bien por redes paralelas. Así, el transporte de agua o electrolitos, o también la absorción de pequeñas moléculas (peso molecular generalmente inferior a aproximadamente 1000 Da) a nivel de la mucosa ocular se efectúa por vía transcelular, es decir a través de las células epiteliales. Por el contrario, la absorción de grandes moléculas y el paso de antígenos y/o toxinas, se hace principalmente por vía paracelular, a nivel de las "uniones estrechas" que se disponen entre las células epiteliales [(Gobbels M. et al. *Fortschr. Ophthalmol* 1990; 87 (6): 646-8), (Noske W et al. *Arch clin Exp Ophthalmol* 1994; 232 (110): 608-13), (Sugrue SP et Zieske JD. *Exp Eye Res* 1997; 64: 11-20); (Hamalunem M et al. *Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38 (36): 27-34)].

Las uniones estrechas (JS) epiteliales [o "tight junction", (TJ)] son estructuras de unión entre las células que bordean los epitelios mucosos. Aseguran y controlan, a nivel del ojo, el transporte transepitelial paracelular de la película lacrimal, así como de macromoléculas variadas (alergenos, irritantes, toxinas, microorganismos, etc.) hacia los tejidos del ojo. Estas estructuras flexibles, conectadas a los elementos del citoesqueleto, compuestas por filamentos de actina y de miosina (Turner JR et al. *Am J Physiol* 1997; 273 (4Pt):C1378-85), se forman por la asociación de proteínas transmembranales (occludina, claudinas) y de proteínas citoplasmáticas [(proteínas zonula occludens ZO-1, ZO-2, cingulinas), (Sugrue SP et Zieske JD *Exp Eye Res* 1997; 64: 11-20), (Y) X et al. *Ophthalmol Sci Res* 2000; 41 (13): 4093-100)]. Por consiguiente, el epitelio de la superficie ocular, por su estructura anatómica y la cualidad de su interfaz con la película lacrimal, cuya acción es drenar y eliminar permanentemente los microorganismos, los cuerpos extraños y las células epiteliales desescamadas, asegura una función de barrera necesaria para la protección de los constituyentes celulares subyacentes y del medio endocular.

Sin embargo, cierto número de agentes agresivos pueden dañar la estabilidad de esta barrera ocular provocando alteraciones de la permeabilidad transepitelial ligadas a modificaciones de la permeabilidad paracelular. Una permeabilidad acrecentada favorece la penetración acrecentada de ciertos alergenos, patógenos y moléculas químicas hacia las células subyacentes.

El estrés oxidativo, liberando radicales libres oxigenados, ocupa un lugar importante en la génesis de patologías que afectan la superficie ocular. Los radicales libres son especies químicas muy reactivas, tóxicas, que alteran las membranas de las células epiteliales. El anión superóxido liberado a partir del oxígeno molecular reacciona con el peróxido de hidrógeno para formar el radical hidroxilo. Este último reacciona a su vez con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas provocando así la formación de peróxidos lipídicos, muy agresivos, que son el origen de profundas desorganizaciones membranales [Fridovich I. *Science* 1978; 201 (4359): 875-80]. Estudios *in vitro* muestran que un déficit de vitamina A es el origen de una alteración de la permeabilidad con reducción de la permeabilidad paracelular al manitol ³H, queratinización del epitelio conjuntivo (Huang AJ et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 (3): 429-35 1991) y pérdida de células calciformes.

En el caso de la sequedad ocular, diferentes factores pueden ser el origen de una alteración del epitelio. Estas afecciones oculares pueden ser provocadas por una exposición a radiaciones (ultravioletas A y B, rayos X, cirugía fotorefractiva), bacterias, virus, hongos, alergenos, el uso de lentillas (Mc Namara NA et al. *Br J Ophthalmol* 1998; 82 (4): 376-81). Pueden tener un origen genético como en el síndrome de Gougerot-Sjögren.

También se pusieron de manifiesto alteraciones de la permeabilidad paracelular de la córnea. Éstas están ligadas a una deshidratación aguda o crónica de la superficie ocular (Lofebalo L et al. Int J Immunopathol Pharmacol 1999; 12 (3): 133-7), Kabuyonna I et Arakawa T J Ocul Pharmacol Ther 2003; 19 (3): 281-9).

5 La permeabilidad del epitelio ocular de superficie, como lo muestra la utilización de la peroxidasa del rábano picante (HRP), se puede alterar por la presencia de conservantes de colirios o de sustancias antisépticas tales como los amonios cuaternarios. El cloruro de benzalconio (BAC o BAK) que entra en la totalidad de los colirios multidosis, como los colirios anti-glaucoma, incluso en dosis muy bajas, provoca también la lisis de las membranas de las células de la superficie ocular (Tonjum AM. Acta Ophthalmol (Copenh) 1979; 53 (3): 335-47) y alteraciones de la permeabilidad paracelular.

10 Además, alteraciones de la permeabilidad, tanto a nivel de la conjuntiva como de la córnea, pueden aparecer a consecuencia de traumatismos de la superficie ocular, durante las fases de cicatrización. Así, la realización de una biopsia provoca un aumento de la permeabilidad paracelular, relacionada con el estado del epitelio (Huang AJ et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990; 32 (3): 633-39).

15 Por consiguiente, la alteración de las uniones estrechas epiteliales de la superficie ocular puede ser el origen de una sensibilización, siendo capaces de atravesar este epitelio ciertos alérgenos, patógenos y/o moléculas químicas para interaccionar con las células inmunitarias del ojo. Las condiciones en las cuales es posible esta transferencia están poco documentadas *in vitro* y hasta hoy día no se ha aportado ninguna demostración de la implicación de estas uniones *in vivo* en el desarrollo de una sensibilización. Además, se conoce que la presencia incrementada de microorganismos, alérgenos y/o moléculas químicas es el origen de fenómenos alérgicos e inflamatorios, frecuentemente acompañados de dolores que pueden ocasionar una patología crónica.

20 La presente invención resulta de la evidencia *in vivo* del papel que juegan las uniones estrechas del epitelio en las patologías oculares, en particular en las patologías que afectan la superficie ocular. La abertura de las uniones estrechas provocada por una reacción alérgica consecutiva a la instilación de un agente de degranulación de los mastocitos (producto 48/80: condensado de N-metil-p-metoxifenetilamina y formaldehído) o de una sustancia química irritante como el cloruro de benzalconio, modifica la permeabilidad paracelular del epitelio ocular. La presente invención propone, por primera vez, un enfoque terapéutico de las patologías oculares, particularmente de las patologías oculares de superficie, basado en la utilización de compuestos o condiciones que permiten modular la tensión del citoesqueleto de dichas células epiteliales oculares. Así, estos compuestos o condiciones permiten modular la tensión del citoesqueleto de las células epiteliales oculares o regular directamente, preferentemente disminuir, incluso bloquear, la abertura de las uniones estrechas del epitelio ocular. Este enfoque permite especialmente controlar la abertura o el cierre de las uniones estrechas del epitelio ocular, sin recurrir necesariamente a una nueva síntesis proteica y/o a importantes degradaciones proteicas y/o estructurales del epitelio. La invención permite regular la permeabilidad de la superficie ocular de manera específica, fina y reactiva, y también actuar sobre la transferencia de alérgenos, de patógenos y/o de moléculas químicas hacia las células inmunitarias. Las composiciones según la invención se adaptan particularmente bien para la obtención de un efecto biológico rápido y controlable en el tiempo (reversible).

25 La reacción de infiltración de polinucleares neutrófilos en el humor acuoso a consecuencia de la deposición sobre la córnea de un agente de degranulación de los mastocitos, el producto 48/80, se caracteriza por una infiltración de células polinucleares neutrófilas, descrita en la bibliografía (Allansmith et al. Acta Ophthalmol 1989; 192: 145-153S). Los inventores pusieron de manifiesto que la infiltración está asociada al aumento de actividad de la mieloperoxidasa (MPO), enzima liberada por los neutrófilos activados, y que este aumento se podía prevenir por el tratamiento previo con ayuda de un inhibidor de la contracción del citoesqueleto de las células epiteliales, el ML-7, que tiene por efecto inhibir la acción de la quinasa que cataliza la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina. Este efecto corresponde a una reducción de la tensión del citoesqueleto de las células epiteliales de la córnea, inducida por la inflamación, y que tiene como consecuencia el suprimir dicha inflamación ligada a la acumulación de neutrófilos en el humor acuoso.

30 En una segunda serie de ensayos, los inventores demostraron igualmente que la irritación de la córnea por la instilación de una solución de cloruro de benzalconio depositada durante 10 minutos antes del enjuague, ocasionaba un aumento de la MPO en el ojo. Esto, muy importante incluso después de 6 horas, se suprime igualmente por un tratamiento previo con ayuda de ML-7, administrado por vía intraperitoneal.

35 Por tanto, en estos ensayos, parece ser que el ML-7 es capaz de prevenir la inflamación oponiéndose a la penetración ocular de los agentes de agresión (P48/80 y cloruro de benzalconio).

40 Por tanto, un primer objeto de la invención reside, más particularmente, en la utilización de un compuesto que module la tensión del citoesqueleto de las células epiteliales oculares, particularmente de las células epiteliales oculares de superficie, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento preventivo o curativo de patologías oculares de superficie en el ser humano o animal.

45 Otro objeto de la invención reside en una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto modulador de la tensión del citoesqueleto (en particular modulador de la abertura de las uniones estrechas) de las

células epiteliales oculares de superficie, y un excipiente aceptable a nivel farmacéutico, estando formulada dicha composición para una administración por vía local (vía, por ejemplo, de un colirio, un gel, etc., aplicable directamente sobre el ojo).

5 La invención reside igualmente en el tratamiento preventivo o curativo de las patologías oculares, particularmente de las patologías oculares de superficie, que comprende la administración a un mamífero, especialmente a un individuo humano o animal, de una cantidad eficaz de un compuesto que modula la tensión del citoesqueleto de células epiteliales oculares.

10 La invención se basa en la utilización de compuestos que modulan (preferentemente inhibiendo) la tensión y el estado de contracción del citoesqueleto de las células epiteliales oculares, particularmente de las células epiteliales oculares del segmento anterior del ojo. Como se ha indicado anteriormente, este enfoque permite controlar la abertura y el cierre de las uniones estrechas del epitelio ocular sin recurrir necesariamente a una nueva síntesis proteica y/o a importantes degradaciones proteicas y/o estructurales del epitelio.

15 Las proteínas que componen las uniones estrechas están asociadas al citoesqueleto de las células que ellas unen. La invención permite modular la tensión del citoesqueleto en el caso de individuos afectados por enfermedades o desórdenes oculares, con el fin de actuar de manera no destructiva y transitoria sobre la permeabilidad del epitelio ocular. Así, la contracción del citoesqueleto favorece la abertura de las uniones estrechas, mientras que una relajación del citoesqueleto (o una inhibición de la contracción) favorece el cierre de dichas uniones.

20 Por tanto, en el marco de la invención se utilizan preferentemente compuestos que modulan la contracción del citoesqueleto de las células epiteliales oculares. Según la condición a tratar, se utilizarán compuestos que inhiben o, por el contrario, activan o favorecen la contracción del citoesqueleto de células epiteliales oculares.

25 La actividad del compuesto sobre la tensión del citoesqueleto puede ser directa o indirecta, es decir dirigida a los constituyentes mismos del citoesqueleto o a los reguladores de su tensión. Se prefieren los compuestos que actúan de manera directa sobre la tensión del citoesqueleto. Se prefieren particularmente los compuestos que presentan una actividad selectiva sobre la tensión del citoesqueleto, es decir típicamente los compuestos que no afectan directamente la estructura de las proteínas constitutivas de las uniones estrechas.

30 En el sentido de la invención, un compuesto se considera que modula la tensión del citoesqueleto cuando modula la abertura de las uniones estrechas. Un efecto inhibitorio de la contracción o de la tensión de los filamentos de actina y/o de miosina no debe ser necesariamente completo o total. Es suficiente que disminuya la contracción o la tensión del citoesqueleto suficientemente para reducir la abertura de las uniones estrechas. Esta reducción corresponde a una disminución mínima de aproximadamente 25%, de preferencia aproximadamente 30% y, de modo todavía más preferido, de aproximadamente 50%, de la permeabilidad paracelular del epitelio ocular.

Los compuestos que se pueden utilizar en el marco de la presente solicitud permiten modular la tensión del citoesqueleto. Se trata de un agente (por ejemplo, de una molécula) o de una combinación o asociación de agentes tales como se definen en las reivindicaciones.

35 Estos compuestos inhiben (o modulan) la contracción o la tensión de las cadenas ligeras de miosina y/o actina, o inhiben (o modulan) la degradación de la actina.

Tales compuestos son inhibidores de la quinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK).

40 Son inhibidores selectivos de la MLCK, a saber el compuesto ML-7 {1-(5-yodonaftaleno-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepina} (Makishima M. et al. Feb Lett 1991; 287: 175) o el compuesto ML-9 (Wilson DP et al. 2001). Estos compuestos se utilizan en el tratamiento del glaucoma (documento WO 97/30701; Exp. Eye Res. 2002, 75: 135-142).

45 Otras dianas que actúan sobre la tensión del citoesqueleto son especialmente las proteínas de unión a la miosina tales como, por ejemplo, la cingulina, o las moléculas de unión tales como la cadherina-E, la catenina-alfa o las desmosomas. La modulación de la actividad o de la expresión de estas proteínas permite regular la tensión del citoesqueleto.

50 Según otro modo de realización, se pueden utilizar composiciones inhibitorias de la síntesis de proteínas u otras moléculas que aseguren la unión entre las proteínas del citoesqueleto y las proteínas de las uniones estrechas. Entre las proteínas de las uniones estrechas se pueden citar especialmente las proteínas ocludinas, claudinas, ZO-1 y ZO-2. Un medio para modular la abertura o el cierre de las uniones estrechas reside, por tanto, en la regulación de la síntesis de las proteínas de unión entre el citoesqueleto y las proteínas de las uniones estrechas. Estimulando esta síntesis, se espera un refuerzo de las uniones entre las uniones cerradas y el cicloesqueleto, las cuales conducen a una permeabilidad más baja del epitelio.

Otros compuestos utilizables son, por ejemplo, los inhibidores de quinasas activadas por los mitógenos (MAPKK), especialmente de la quinasa MEK1 o de la quinasa P13, tales como los compuestos PD098,059 {2-(amino-3-

metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona} (Alessai et al., J Biol Chem 1995: 270: 27589) ó LY294002 [2-(4-morfolinil)-8-fenil-1(4H)-benzopiran-4-ona] (Vlahos et al. J Biol Chem, 1994; 269: 5441).

5 Otras moléculas utilizables para regular, de manera indirecta, la tensión del citoesqueleto son los factores de crecimiento, tal como el factor de crecimiento endotelial (EGF) o ciertas citoquinas susceptibles de ser liberadas por los inmunocitos tales como las interleuquinas-1, -4, -13, o los factores tales como IGF-1 o el interferón gamma.

10 Otro enfoque que permite regular de manera indirecta la tensión del citoesqueleto se basa en la utilización del péptido GLP2 ("glucagon-like peptide 2) o de sus derivados, que pueden permitir alterar la permeabilidad del epitelio ocular por un efecto indirecto sobre la contracción del citoesqueleto. Igualmente, ciertas moléculas que actúan sobre los receptores situados en el polo apical de las células epiteliales (ejemplo: los receptores de proteinasas; PAR-2) pueden actuar indirectamente sobre el citoesqueleto.

La invención comprende la utilización de agentes tales como los descritos en las reivindicaciones, los cuales actúan de manera directa sobre la tensión del citoesqueleto, especialmente moléculas inhibitoras de la contracción del citoesqueleto, particularmente moléculas inhibitoras de la contracción o de la tensión de las cadenas ligeras de miosina y/o actina, o inhibitoras de la degradación de la actina.

15 Como se indicó anteriormente, los compuestos utilizados son ventajosamente moléculas que pueden estar en forma aislada o en forma de combinación de extractos biológicos, etc. Estas moléculas pueden ser sintéticas, semisintéticas o biológicas, especialmente de origen animal, viral, vegetal o bacteriano.

La presente invención se puede utilizar para el tratamiento o para la toma en consideración de patologías o desórdenes oculares, particularmente de afecciones oculares de superficie.

20 La invención se refiere particularmente a la utilización de un compuesto, tal como el descrito anteriormente, que modula la tensión del citoesqueleto de células epiteliales oculares para la preparación de un medicamento destinado a controlar (preferentemente, reducir) la permeabilidad paracelular del epitelio ocular en el caso de individuos atacados por afecciones oculares, particularmente afecciones oculares de superficie.

25 Según la invención, las utilizaciones mencionadas anteriormente son particularmente eficaces en el tratamiento de una afección ocular seleccionada entre una queratitis, una conjuntivitis, el síndrome del ojo seco y cualquier otra alteración de la permeabilidad paracelular del epitelio ocular. Ejemplos de situaciones susceptibles de provocar una alteración de este tipo son, por ejemplo, el uso por parte de un paciente de lentes de contacto o también las fases de cicatrización en el caso de un individuo que padece una lesión traumática o quirúrgica del epitelio ocular.

30 En particular, la presente invención está adaptada particularmente para el tratamiento preventivo o curativo de una sensibilización a un alérgeno. La alergia del segmento anterior del ojo es una patología ocular frecuente que concierne a un 25% de las poblaciones norteamericana y europea. El número de pacientes afectados por este tipo de alergia está en continua evolución en razón de factores medioambientales y/o del aumento de la duración de la vida. A nivel de la córnea del ojo, esta alergia es el origen de queratitis alérgicas. A nivel de la conjuntiva, la alergia es responsable de conjuntivitis que se traducen en un ojo rojo.

35 Las conjuntivitis alérgicas son de varios tipos: se observan las conjuntivitis estacionales, las conjuntivitis domésticas, las conjuntivitis provocadas por el uso de lentes de contacto (papilar gigante) tales como las mencionadas anteriormente, las conjuntivitis atópicas y las conjuntivitis que tienen por origen la utilización de cosméticos.

40 La inflamación provocada por los radicales libres frecuentemente liberados bajo la influencia de factores medioambientales (polución, aire acondicionado, agentes químicos, etc.), alcanza la córnea y la conjuntiva. Es el caso de la conjuntivitis vernal, forma muy extendida en el caso de niños y adolescentes. Existe también una queratoconjuntivitis atópica que aparece en el caso de pacientes de más edad que padecen erupciones cutáneas. Esta forma de conjuntivitis no estacionaria, si no es tratada, puede ocasionar lesiones graves en la córnea y la conjuntiva.

45 La presente invención se puede utilizar para el tratamiento o para la toma en consideración de todas las patologías oculares de superficie engendradas por microorganismos, tales como las conjuntivitis bacterianas (las queratitis son complicaciones inducidas frecuentemente por este tipo de conjuntivitis) y las conjuntivitis virales (adenovirus), con mucha frecuencia bilaterales (asociadas igualmente lo mas frecuentemente a una queratitis), con fotofobia intensa, dolores y enrojecimientos.

50 La presente invención se puede utilizar igualmente para el tratamiento preventivo o curativo o para la toma en consideración de sequedades oculares con fuerte componente inmuno-inflamatorio. Más de 10 millones de personas en EE.UU. (que representan el 15% de la población con edades superiores a 65 años) sufren esta agresión de la superficie ocular.

En esta patología hay que distinguir dos tipos de síndromes:

- los síndromes secos simples son engendrados por los factores medioambientales (polución, radiaciones, aire acondicionado, uso de lentillas, pantallas de ordenador, etc.) agravados por la edad, la menopausia y ciertos tratamientos.
- las formas más graves están asociadas frecuentemente a factores genéticos como el síndrome de Gougerot-Sjögren. Acaban en una enfermedad crónica muy invalidante para los pacientes y que en los casos más graves pueden ocasionar una ceguera.

La inflamación crónica está siempre omnipresente en el ojo; puede ser primaria como en el síndrome de Gougerot-Sjögren, o secundaria como en la queratitis seca.

La presente invención se puede utilizar para prevenir o tratar cualquier inflamación de la superficie ocular en el caso de individuos expuestos a conservantes (sustancias antisépticas), en particular en el caso de individuos que presentan signos de intolerancia ligados a una inflamación clínica o infraclínica provocada por una exposición de este tipo. Los conservantes más conocidos en el mercado son los amonios cuaternarios como el cloruro de benzalconio (BAC) que entra en la composición de colirios multidosis de los registrados para el tratamiento del glaucoma. Estos conservantes, que provocan la liberación de radicales libres y una apoptosis de las células oculares, alcanzan el epitelio de la córnea y estimulan la infiltración de la conjuntiva por células inflamatorias.

Otro objeto particular de la invención reside en la utilización de un compuesto, tal como el definido anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado a reducir, en el caso de un paciente, el paso de una molécula conocida por su efecto inflamatorio, tal como un conservante de colirio multidosis (preferentemente utilizado en el tratamiento del glaucoma).

La presente invención se puede utilizar de manera preventiva en el caso de individuos que presentan predisposiciones o una sensibilidad a los desórdenes mencionados anteriormente, o de manera curativa durante eventos patológicos que se manifiestan en forma de crisis o de manera crónica. Las composiciones según la invención permiten atenuar los síntomas de los individuos, particularmente su sufrimiento y/o la causa se estos desórdenes.

Así, otro objeto particular de la invención reside en la utilización de un compuesto, tal como el definido anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado a reducir la permeabilidad paracelular del epitelio ocular en el caso de individuos que padecen enfermedades inflamatorias oculares agudas o crónicas.

La presente invención es utilizable de manera preventiva y/o curativa, por ejemplo en el caso de individuos de más edad, en los cuales la permeabilidad paracelular se encuentra incrementada (Nzekwe EU y Maurice DM. J Ocul Pharmacol 1994; 10 (3): 521-3).

La presente invención demuestra de manera sorprendente que la supresión del aumento de la permeabilidad paracelular asociada a la abertura de las uniones estrechas impide la aparición de desórdenes oculares, particularmente de los desórdenes oculares de superficie.

Un objeto particular de la invención reside en la utilización de un compuesto tal como el definido anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado especialmente a reducir la permeabilidad paracelular y la sensibilización a los alérgenos, a los patógenos y/o a las moléculas químicas, en el caso de individuos afectados por alergias oculares, o sensibles a ellas.

La invención se refiere igualmente a los métodos de prevención o tratamiento de las condiciones patológicas mencionadas anteriormente, que comprenden la administración a un individuo afectado por una patología ocular o sensible a tales patologías, de un compuesto o tratamiento tal como el definido anteriormente. Preferentemente, el compuesto o tratamiento se administra en una dosis eficaz para reducir la permeabilidad paracelular del epitelio ocular de superficie y/o reducir la sensibilidad al dolor y/o reducir la migración transepitelial de alérgenos hacia los tejidos de la córnea o conjuntiva.

El compuesto se puede administrar por diferentes vías y de diferentes formas. Así, el compuesto se puede presentar en forma líquida o sólida, típicamente en forma de colirio, gel, supositorio, solución inyectable o en forma bebible, etc. Se prefieren los compuestos formulados de manera a poderse administrar localmente (colirio o gel, por ejemplo) o también por vía oral (soluciones bebibles, comprimidos, ampollas, etc). Cabe entender que son posibles otras formas de administración tales como inyecciones (intravenosas, intraperitoneales, intradérmicas, subcutáneas, intramusculares, intraarteriales, etc).

Los compuestos como los definidos en la presente invención se pueden utilizar solos, en combinación y/o en asociación con al menos otro agente activo, tal como, por ejemplo, otras sustancias utilizadas en el tratamiento de las patologías oculares, en particular de las patologías oculares de superficie. Se pueden citar, por ejemplo, las lágrimas artificiales, ciertos antioxidantes, las diferentes formas de ciclosporina, los agentes antisépticos, antibióticos o antivirales, etc. Estos diferentes agentes se pueden utilizar en combinación terapéutica, administrados en forma separada, combinada, escalonada en el tiempo o concomitante.

Así, un objeto particular de la invención se refiere a la utilización de un compuesto tal como el descrito anteriormente, en combinación con una composición antiséptica, antibiótica o antiviral, para la preparación de un medicamento destinado a reducir la permeabilidad paracelular del epitelio ocular en un individuo afectado por una patología ocular engendrada por el paso de microorganismos, tal como una queratitis bacteriana y/o viral.

- 5 Otro objeto de la invención reside en una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto modulador de la tensión del citoesqueleto (en particular de la abertura de las uniones estrechas) de células epiteliales oculares, particularmente de células epiteliales oculares de superficie, y un excipiente aceptable a nivel farmacéutico, estando formulada dicha composición para una administración por vía local (colirio o gel, por ejemplo). Preferentemente, la composición se presenta en forma de colirio y/o gel. Los excipientes adaptados a la formulación en forma de gel o colirio se pueden elegir entre agua ppi (preparación para inyección), hidróxido de sodio, glicerol, hipromelosa, alcohol polivinílico, sorbitol, glucanato de potasio, agua destilada, cloruro de sodio, borato de sodio, ácido bórico, ácido cítrico, hidrógenofosfato de sodio, metilhidroxipropilcelulosa, polisorbato 20, metabisulfito de sodio, edetato de sodio, parahidroxibenzoato de metilo, cloruro de benzalconio, aceite de vaselina y clorobutanol. Preferentemente, el excipiente se elige entre glicerol, cloruro de benzalconio, hidróxido de sodio y agua ppi.
- 10
- 15 La cantidad de compuesto modulador de la tensión del citoesqueleto (particularmente de la abertura de las uniones estrechas) de células epiteliales oculares en la composición según la invención varía en gran medida y, en particular, en función de la naturaleza del producto elegido, del estado del individuo a tratar, de la patología a tratar y/o del efecto deseado. Así, el experto en la materia es capaz de establecer la cantidad eficaz de compuesto modulador de la tensión del citoesqueleto (particularmente de la abertura de las uniones estrechas) de las células epiteliales oculares en la composición y/o para el tratamiento según la invención.
- 20

Otros aspectos y ventajas de la presente invención surgirán con la lectura de los ejemplos siguientes, que deben ser considerados como ilustrativos.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

25 Figura 1: Protocolo experimental del ejemplo 1. Los animales recibieron por vía intraperitoneal (IP) dos tratamientos previos de ML7 (1 mg/kg) la víspera de la instilación del P48/80 (mañana y tarde) y uno, 2 horas antes de la instilación.

30 Figura 2: Actividad de la MPO (mieloperoxidasa) del ojo e influencia del P48/80 y del ML-7. En condiciones basales, la actividad de la MPO del ojo es escasa ($8,5 \pm 1,2$ U/g.prot) y los valores no son diferentes entre los 2 ojos. El tratamiento del ojo izquierdo con el P48/80 provoca un fuerte aumento de la actividad de la MPO ($43,1 \pm 11,3$ U/g.prot) correspondiente a un aumento del 407% que significa la acumulación de neutrófilos. Este aumento se suprime con el ML-7.

Figura 3: Protocolo experimental del ejemplo 2. Los animales recibieron por IP dos tratamientos previos de ML7 (1 mg/kg) la víspera de la instilación del BAK 0,1% (mañana y tarde) y uno, 2 horas antes de la instilación. Fueron sacrificados 6 horas después del enjuague y los dos ojos se extirparon con el fin de medir la actividad de la MPO.

35 Figura 4: Actividad de la MPO (mieloperoxidasa) del ojo e influencia del cloruro de benzalconio y del ML-7. En condiciones basales, la actividad de la MPO del ojo es $8,2 \pm 1,9$ U/g. proteínas. La administración en el ojo de una solución al 0,1% de cloruro de benzalconio provoca, al cabo de 6 horas, un aumento muy claro de la MPO total del ojo ($26,4 \pm 7,2$ U/g. proteínas) correspondiente al 321%. Este aumento se suprime después del tratamiento previo con ML-7 administrado por vía IP.

40 Figura 5: Influencia del ML-7 sobre la acumulación de polinucleares eosinófilos en la unión córneo-conjuntiva inducida por el ML-7. Infiltración de polinucleares eosinófilos inducida por la instilación de 10 μ L de BAK. Al cabo de 6 horas, el aumento de eosinófilos es muy significativo. Esta infiltración de eosinófilos se inhibe por el ML-7 administrado localmente.

Arriba, imágenes histológicas después de la tinción con Direct Red.

45 Abajo, cómputo de los de eosinófilos a nivel del plexo venoso de la esclerótica, densidad por mm^2 (medias \pm ESM; n=8)

Figura 6: Influencia comparada del cloruro de benzalconio (BAK), del PBS (disolvente) y del BAK con el tratamiento previo local con el ML-7 sobre el grado de penetración del fluorocromo a través de la córnea, en la rata.

50 Imágenes obtenidas por fluorescencia de la superficie externa de la córnea de rata observada después de la biotínización *ex vivo* del ojo entero por avidina-fluoresceína después de su sección en estado de congelación (6 μm) (cara externa de la córnea hacia arriba).

Ejemplos**Ejemplo 1: Efectos de un inhibidor de la MLCK (ML-7) administrado por vía sistémica (IP) sobre la inflamación ocular inducida por administración sobre la córnea de un producto de degranulación mastocitaria.**

5 El modelo de irritación de la córnea utilizado fue objeto de una validación en la rata (Allansmith et al. Acta Ophthalmol, 1989; 192S: 145-153) y en el conejo (Bucolo et al., J. Ocul. Pharmacol. 1993; 9: 321-332).

a) Material y métodos:

Animales: se utilizaron tres lotes de 8 ratas macho Wistar (200-250 g) dispuestas en jaulas individuales. Los animales recibieron una alimentación estándar (UAR, Villemoisson, Epinay sur Orge) y agua a voluntad.

10 *Inducción de la inflamación:* la inflamación fue inducida por instilación en el ojo de 10 µl de una solución de P48/80 al 10% (0,1 g/ml). El ojo testigo recibió 10 µl de PBS 1X.

15 *Medición de la actividad de la mieloperoxidasa:* los ojos aislados fueron homogeneizados en tampón fosfato con ayuda de un politron. A continuación fueron sometidos a tres ciclos de congelación (nitrógeno líquido)/descongelación (baño maría a 37°C). Después de la centrifugación (15 min, 10.000 rpm, 4°C), los sedimentos se recogieron en tampón HATB y se sonicaron durante 10 segundos. Después de una nueva centrifugación, se midió la actividad de la MPO a partir de los sobrenadantes y de un tampón reactivo que contiene O-dianisidina hidrocloreuro y peróxido de hidrógeno al 0,0005%. El cambio de absorción a 460 nm se midió con ayuda de un espectrofotómetro.

20 *Protocolo experimental:* los animales recibieron por IP dos tratamiento previos de ML7 (1 mg/kg) la víspera de la instalación del P48/80 (mañana y tarde) y uno, 2 horas antes de la instilación.

Fueron sacrificados 6 horas después de la instilación y se extirparon los ojos con el fin de medir la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) total del ojo entero (cf. Figura 1).

b) Resultados (cf.: Figura 2):

25 En condiciones basales, la actividad de la MPO del ojo es débil ($8,5 \pm 1,2$ U/g.prot.) y los valores no son diferentes entre los 2 ojos. El tratamiento del ojo izquierdo con P48/80 provoca un fuerte aumento de la actividad de la MPO ($43,1 \pm 11,3$ U/g.prot.) correspondiente a un aumento de 407% que significa la acumulación de neutrófilos. Este aumento se suprime por el ML-7.

Ejemplo 2: Efectos de un inhibidor de MLCK (ML-7) sobre la inflamación ocular (infiltración de neutrófilos) inducida por instilación sobre la córnea de cloruro de benzalconio.

30 El modelo de irritación de la córnea por sales de benzalconio (BAK) fue ampliamente utilizado tanto *in vitro* como *in vivo*. El protocolo utilizado procede de un estudio *in vitro* (XU et al. 2000) adaptado al estudio *in vivo* en la rata después de ensayos preliminares para ajustar el tiempo y las concentraciones.

a) Material y métodos:

35 *Animales:* se utilizaron ratas macho Wistar (200-250 g) dispuestas en jaulas individuales. Los animales recibieron una alimentación estándar (UAR, Villemoisson, Epinay sur Orge) y agua a voluntad.

Inducción de la inflamación: la inflamación fue inducida por instilación en el ojo de 10 µl de una solución de BAK al 0,1% (1 mg/ml). El ojo testigo recibió 10 µl de PBS 1X. Diez minutos después de la instilación los ojos fueron enjuagados con 1 ml de agua estéril.

40 *Medición de la actividad de la mieloperoxidasa:* los ojos aislados fueron homogeneizados en tampón fosfato con ayuda de un politron. A continuación fueron sometidos a tres ciclos de congelación (nitrógeno líquido)/descongelación (baño maría a 37°C). Después de la centrifugación (15 min, 10.000 rpm, 4°C), los sedimentos se recogieron en tampón HATB y se sonicaron durante 10 segundos. Después de una nueva centrifugación, se midió la actividad de la MPO a partir de los sobrenadantes y de un tampón reactivo que contiene O-dianisidina hidrocloreuro y peróxido de hidrógeno al 0,0005%. El cambio de absorción a 460 nm se midió con ayuda de un espectrofotómetro.

45 *Protocolo experimental:* los animales recibieron por IP dos tratamiento previos de ML7 (1 mg/kg) la víspera de la instalación del BAK 0,1% (mañana y tarde) y uno, 2 horas antes de la instilación. Fueron sacrificados 6 horas después del enjuague y se extirparon los ojos con el fin de medir la actividad de la MPO (cf. Figura 3).

b) Resultados (cf.: Figura 4):

En condiciones basales, la actividad de la MPO del ojo es de $8,2 \pm 1,9$ U/g. proteínas. La administración en el ojo de una solución al 0,1% de cloruro de benzalconio provoca, al cabo de 6 horas, un aumento muy claro de la MPO total del ojo ($26,4 \pm 7,2$ U/g. proteínas) correspondiente al 321%. Este aumento se suprime después del tratamiento previo con ML-7 administrado por vía IP.

5 **Ejemplo 3: Efectos del ML-7 en administración local sobre la infiltración de eosinófilos y la permeabilidad de las uniones estrechas, inducidas por el cloruro de benzalconio (BAK), a nivel del ojo en la rata.**

a) Material y métodos:

10 *Animales:* Se utilizaron cuatro grupos de ratas macho Wistar (Janvier, Le Genest St Isle, Francia) que pesaban de 300 a 350 g: BAK-carmelosa sódicas, BAK-ML-7, PBS-carmelosa sódica, PBS-ML-7; el PBS y la carmelosa sódica eran los disolventes respectivos del benzalconio (BAK) y del ML-7.

Pretratamiento con ML-7L: los animales recibieron una administración local de ML-7 (Sigma, Francia) 24 horas, 12 horas y 30 minutos antes de la inducción química de la inflamación ocular. Así, los animales recibieron en cada ojo 100 µg de ML-7 en un volumen de 10 µg de colirio (carmelosa sódica 4 mg / 0,4 mL) ó 10 µL de colirio solo.

15 *Inducción de la inflamación:* treinta minutos después de la tercera administración de ML-7 o de colirio solo, los animales recibieron en cada ojo 10 µL de cloruro de benzalconio (Sigma – Aldrich, Steinheim, Alemania) al 0,5% en PBS o 10 µL de PBS. Después de 10 minutos los ojos de todas las ratas fueron enjuagados con 250 µL de agua estéril.

20 *Extirpación de los ojos:* seis horas después de la administración de cloruro de benzalconio o de PBS, los animales fueron anestesiados por administración intraperitoneal de pentobarbital (80 mg/kg) (Ceva Santé Animale, Libourne, Francia), sacrificados por decapitación e inmediatamente se les extirparon los ojos para la congelación directa o después de la biotilación de superficie (ensayo de permeabilidad de las uniones estrechas).

25 *Medición de la infiltración de polinucleares eosinófilos:* los leucocitos polinucleares eosinófilos se tiñeron específicamente con Direct Red y se contabilizaron en la región del plexo venoso de la esclerótica. Así, inmediatamente después de su extirpación, los ojos fueron sumergidos en un medio protector para tejidos en congelación (Tissu Tek ® OCT compound, Sakura Finetek, Inc., CA, EE.UU), congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C. A continuación, se realizaron secciones de 6 µm de espesor en el criostato y se fijaron en acetona fría durante 10 minutos. Después del secado, las secciones se hidrataron por baños sucesivos en tolueno (5, 3 y 2 minutos), después en etanol al 100% (3 y 2 minutos), etanol al 95% (3 y 2 minutos) y etanol al 50% durante 2 minutos. Las secciones fueron teñidas a continuación durante 20 minutos en una solución de rojo Sirio al 0,03% en etanol al 50% (Direct Red 75 dye contenido 30%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), enjuagados en agua corriente durante 5 minutos y después dispuestos en un medio acuoso (glicerol / PBS 50/50 [vol/vol]). El cómputo de eosinófilos, teñidos de rosa vivo sobre fondo claro en la región del plexo venoso de la esclerótica se efectuó por observación al microscopio Nikon Eclipse 90 i equipado con una cámara digital (Nikon DXM1200F). La superficie de la zona de cómputo fue determinada gracias al programa informático de análisis de imagen Nikon Lucia versión 4,8 y los cómputos se expresaron en número de eosinófilos/mm². La comparación de los resultados obtenidos para los cuatro grupos experimentales se realizó por análisis de varianza de una vía, seguido por un ensayo de comparación múltiple de Bonferroni y las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

40 *Medición de la permeabilidad de las uniones estrechas – Biotilación de superficie:* la permeabilidad de las uniones estrechas de la córnea fueron ensayadas por una técnica de biotilación de las proteínas de superficie. El reactivo de biotilación elegido es soluble en agua y contiene una función espaciadora aminocaproilo que reduce el impedimento estérico durante el acoplamiento con la avidina. Así, inmediatamente después de la extirpación, los ojos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y bajo suave agitación en una solución de biotinamidohexanocarboxilato de sodio y 3-sulfo-N-hidroxisuccinimida de 1 mg/mL, en PBS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). A continuación, los ojos se enjuagaron tres veces con PBS, incluidos en un medio protector para tejidos en congelación (Tissue-Tek ® OCT compound, Sakura Finetek, Inc., CA EE.UU), se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C. A continuación, en un criostato se cortaron secciones de 6 µm de espesor y se fijaron en acetona fría durante 10 minutos. Después del secado, las secciones se marcaron durante 30 minutos, a oscuras, con avidina D-FITC (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EE.UU) diluida 250 veces en PBS-Tween que contiene 1% de BSA y se enjuagaron 3 veces durante 5 minutos en PBS-Tween, siempre a oscuras. A continuación, las láminas se pusieron en un medio para fluorescencia (Cappel fluorostab embedding medium, MP Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, EE.UU.) y se observaron al microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90 / equipado con una cámara digital (Nikon DXM1200F). Las imágenes fueron tratadas gracias al programa informático de análisis de imágenes Nikon Lucia versión 4.8. En las secciones no se observó ninguna diferencia significativa de espesor de la córnea entre los diferentes grupos experimentales ($102 \pm 10\mu\text{m}$, $110 \pm 9\mu\text{m}$, $115 \pm 13\mu\text{m}$ y $124 \pm 8\mu\text{m}$ para los grupos BAK-carmelosa sódica, BAK-ML-7, PBS-carmelosa sódica y PBS-ML-7 respectivamente), la profundidad de la marca fluorescente refleja la permeabilidad de las uniones cerradas del epitelio de la córnea externa al reactivo de biotilación.

b) Resultados (cf.: Figuras 5 y 6)

a) Medición de la infiltración de polinucleares eosinófilos (cf. Figura 5)

5 La administración en el ojo de una solución de 10 μ L de cloruro de benzalconio provoca al cabo de 6 horas un aumento muy significativo del número de leucocitos polinucleares eosinófilos, teñidos con Direct Red, en la región del plexo venoso de la esclerótica, lo que demuestra una fuerte inflamación ocular. Esta infiltración de leucocitos polinucleares eosinófilos se inhibe significativamente después del tratamiento previo con ML-7 en administración local.

c) Medición de la permeabilidad de las uniones estrechas: (cf. Figura 6)

10 La administración en el ojo de una solución de 10 μ L de cloruro de benzalconio favorece, después de 6 horas, la abertura de las uniones estrechas del epitelio de la córnea, lo que se traduce en una penetración más profunda del marcador fluorescente y de su difusión. El tratamiento previo con ML-7 suprime este aumento de la difusión y el espesamiento de la zona fluorescente.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un inhibidor selectivo de MLCK para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento preventivo o curativo de patologías oculares de superficie en el ser humano o animal, siendo dicho inhibidor selectivo de MLCK el compuesto ML-7 ó ML-9.
2. Utilización según la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento destinado a controlar la permeabilidad paracelular del epitelio ocular en individuos atacados por afecciones oculares de superficie.
3. Utilización según la reivindicación 2, para la preparación de un medicamento destinado a reducir la permeabilidad paracelular del epitelio ocular en individuos atacados por afecciones oculares de superficie.
4. Utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque la afección ocular se elige entre una queratitis, una conjuntivitis y el síndrome del ojo seco.
5. Utilización según la reivindicación 3, para la preparación de un medicamento destinado a reducir la permeabilidad paracelular del epitelio ocular en un paciente que porta lentillas de contacto.
6. Utilización según la reivindicación 3, en combinación con al menos un agente antiséptico, antibiótico o antiviral, para la preparación de un medicamento destinado a reducir la permeabilidad paracelular del epitelio ocular en un individuo atacado por una patología ocular engendrada por el paso de microorganismos, tal como una queratitis bacteriana y/o viral, administrándose dichos agentes en forma separada, combinada, escalonada en el tiempo, o concomitante.
7. Utilización según la reivindicación 3, para la preparación de un medicamento destinado a reducir la permeabilidad paracelular del epitelio ocular en pacientes expuestos a conservantes.
8. Utilización de la reivindicación 3, para la preparación de un medicamento destinado a reducir la permeabilidad paracelular del epitelio ocular durante las fases de cicatrización, en un paciente que padece una afección traumática o quirúrgica del epitelio ocular.
9. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque el compuesto se administra por vía oral, local, intravenosa o intraperitoneal.

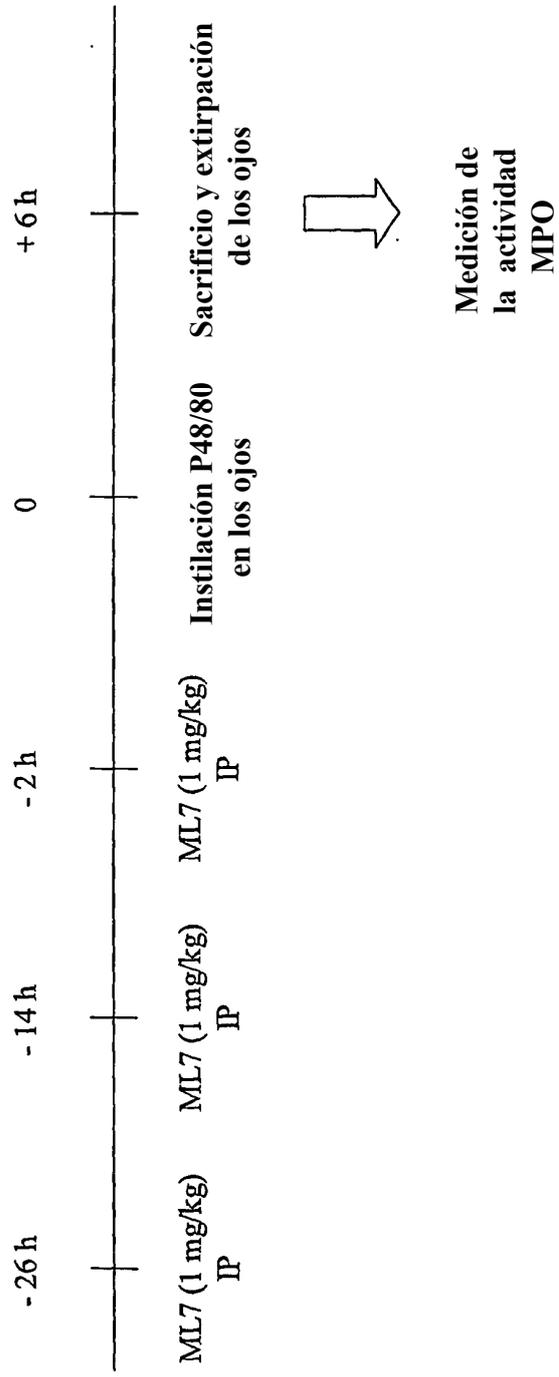
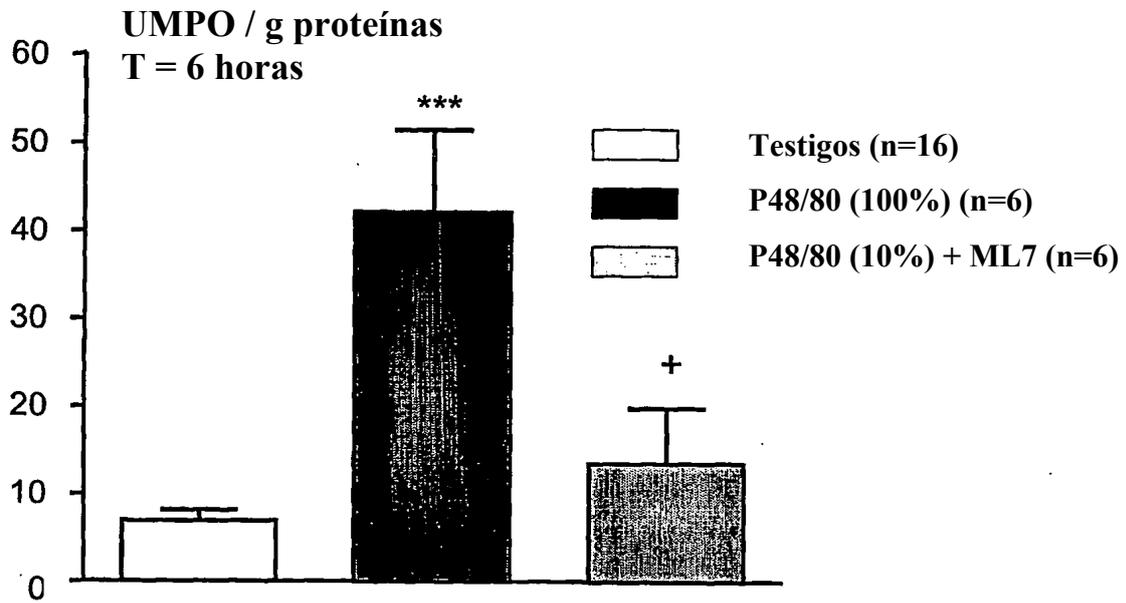


FIGURA 1



*** $p \leq 0.001$ vs testigos

+ $p \leq 0.05$ vs P48/80 10 %

FIGURA 2

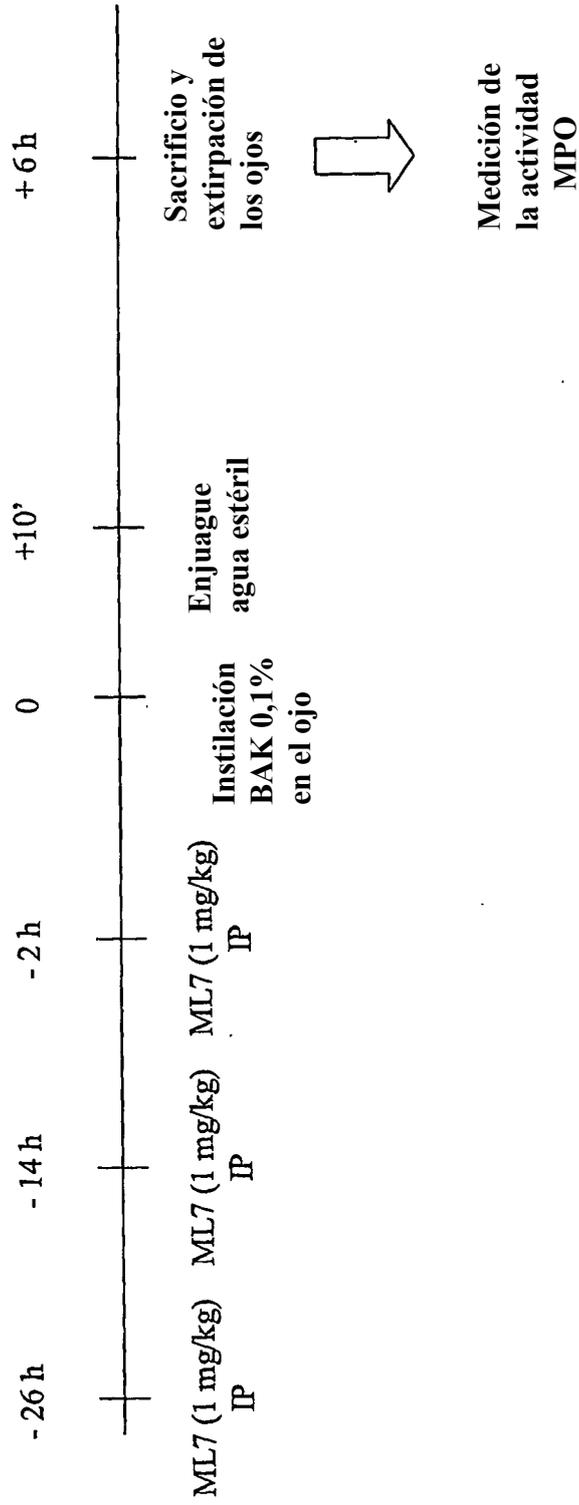


FIGURA 3

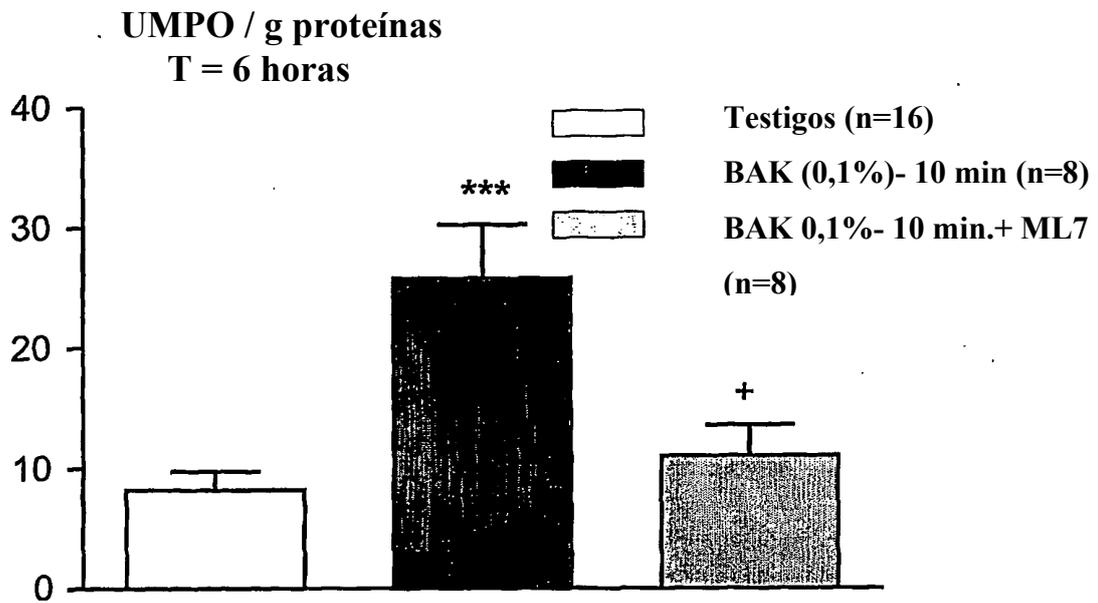


FIGURA 4

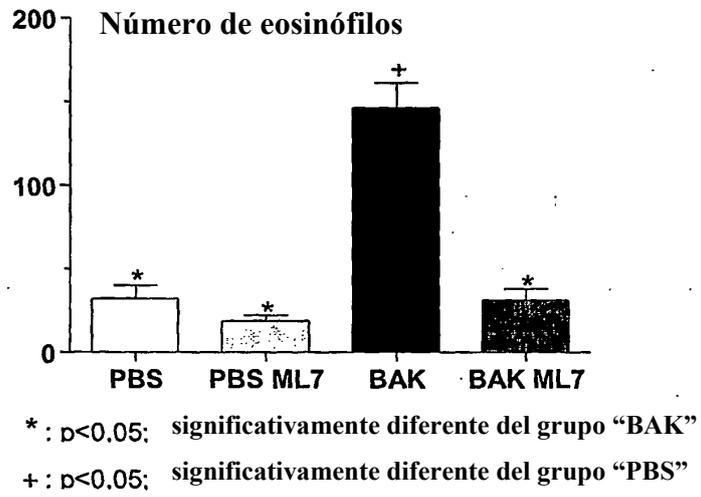
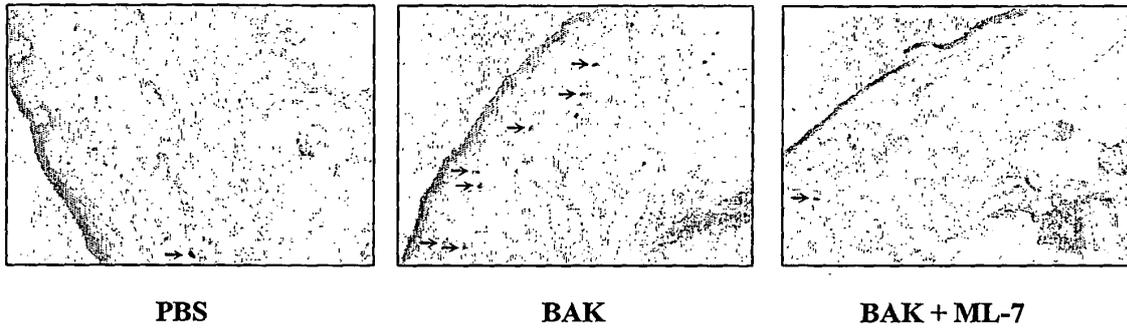


FIGURA 5

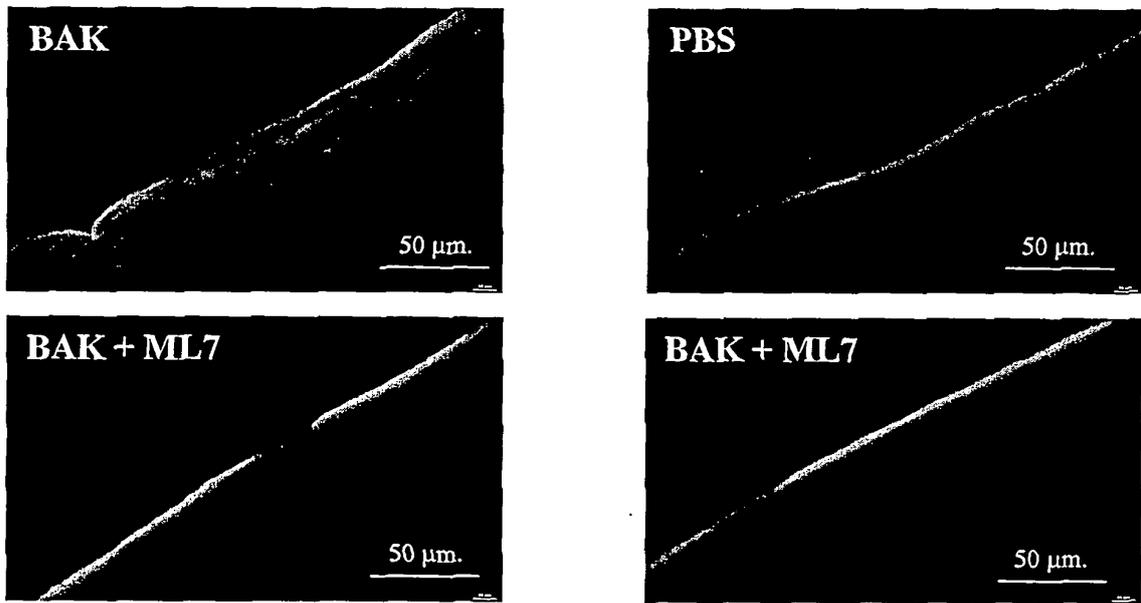


FIGURA 6